

ФОСФОЛІПІДНИЙ СКЛАД ГОМОГЕНАТУ СЕРЦЯ ДОРΟΣЛИХ І СТАРИХ ЩУРІВ ТА ОСОБЛИВОСТІ ЙОГО МОДУЛЯЦІЇ ПРИ СТРЕСІ

Метою роботи було вивчити фосфоліпідний склад гомогенатів серця дорослих і старих щурів, а також встановити вікові особливості його модуляції при іммобілізаційному стресі. Проведені дослідження показали, що розвиток іммобілізаційного стресу в дорослих і старих щурів супроводжується формуванням характерного комплексу змін з боку фосфоліпідного складу гомогенатів серця. Його поява зумовлена посиленням гідролізу фосфоліпідів фосфоліпазою A_2 і зниженням швидкості декарбоксілювання фосфатидилсерину в фосфатидилетаноламін у фосфатидилсериндекарбоксілазній реакції. Вікові відмінності при цьому полягають у кількісних проявах зрушень, що виникають.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: фосфоліпідний спектр, фосфатидилсериндекарбоксілазна реакція, старіння, міокард, іммобілізаційний стрес.

ВСТУП. На сьогодні отримано переконливі докази того, що при старінні відбувається зниження адаптаційних можливостей організму до дії несприятливих факторів зовнішнього середовища [5, 12, 13]. Проте молекулярні механізми розвитку такого феномена все ще не зрозумілі. Їх вивчення відкриває широкі перспективи в розробці нових підходів до лікування та профілактики вікової патології у похилому віці, перш за все захворювань серця і судин. З огляду на це і беручи до уваги особливу роль стимуляції вільнорадикальних процесів у формуванні стресорних та ішемічних уражень міокарда [3, 10, 15], в роботі було проведено вивчення фосфоліпідного складу гомогенатів серця дорослих і старих щурів, а також вікових особливостей його модуляції при іммобілізаційному стресі.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди проведено на 40 щурах-самцях лінії Вістар. Використовували тварин двох груп: дорослих (віком 10–12 місяців) і старих (віком 22–25 місяців). Обидві вікові групи тварин, у свою чергу, поділили на дві підгрупи: 1-ша – інтактні; 2-га – щури, яких піддавали іммобілізаційному стресу шляхом фіксації на спині протягом 30 хв. Ефективність розвитку стресу контролювали за збільшенням рівня адреналіну в крові.

Негайно після припинення іммобілізації тварин декапітували. Вилучали та відмивали

від крові серце. Виділяли міокард лівого шлуночка і гомогенізували з 0,1 М натрій-фосфатним буфером (рН 7,5). Далі 10 % гомогенатів використовували для екстракції ліпідів [2]. Ліпідні екстракти піддавали фракціонуванню за допомогою тонкошарової хроматографії.

Поділ ліпідних фракцій гомогенатів проводили за допомогою одновимірної тонкошарової хроматографії в системі гексан–діетиловий ефір–оцтова кислота у співвідношенні 80:20:1 на скляних пластинках розміром 10 на 15 см із тонким шаром силікагелю (Ляяне Калур, Естонія). При цьому способі поділу пляма фосфоліпідів залишалася на старті [1].

Фракціонування фосфоліпідів здійснювали за допомогою двовимірної тонкошарової хроматографії на пластинках “Kieselgel-60” розміром 7 на 7 см (Merck). Для поділу використовували дві різні системи розчинників. Перша система складалася із суміші хлороформ–метанол–бензол–конц. NH_4OH у співвідношенні 32,5:15:5:3, друга – із суміші хлороформ–метанол–бензол–ацетон–льодяна оцтова кислота–вода у співвідношенні 35:15:5:2,5:2:0,5.

Ідентифікацію фосфоліпідів на пластинках після поділу проводили з використанням величини R_f та за допомогою їх диференційного забарвлення [2].

Розділені фракції зішкрібали з пластинок і екстрагували реактивом Фолча [2]. Екстракти випарювали і піддавали мінералізації з хлорною кислотою при 180 °С протягом 20 хв. У

мінералізатах визначали вміст неорганічного фосфору з використанням реактиву Васьковського [2].

У спеціальних експериментах вивчали швидкість включення радіоактивної мітки з $1-^{14}\text{C}$ оцтовою кислотою до складу фосфоліпідів серця. Для цього щурам внутрішньочеревно вводили нейтралізований розчин $1-^{14}\text{C}$ оцтової кислоти в ізотонічному розчині хлористого натрію в дозі 100 мкКі на 100 г маси. Експозиція становила 24 год. Після цього тварин піддавали декапітації, а їх серце використовували для виділення і фракціонування ліпідів.

Швидкість включення радіоактивної мітки у фосфоліпідів оцінювали за величиною їх питомої радіоактивності. Вимірювали радіоактивність на сцинтиляційному спектрометрі БЕТА-2 з використанням толуольного сцинтилятора.

Концентрацію білка в гомогенатах визначали за методом Лоурі [11].

Отримані дані піддавали статистичній обробці за методом Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Результати експериментів показали, що величина співвідношення фосфоліпідів/білок (ФЛ/білок) у гомогенатах серця старих щурів не відрізнялася від величини співвідношення фосфоліпідів у дорослих тварин (рис. 1). При стресі значення даного показника в щурів обох

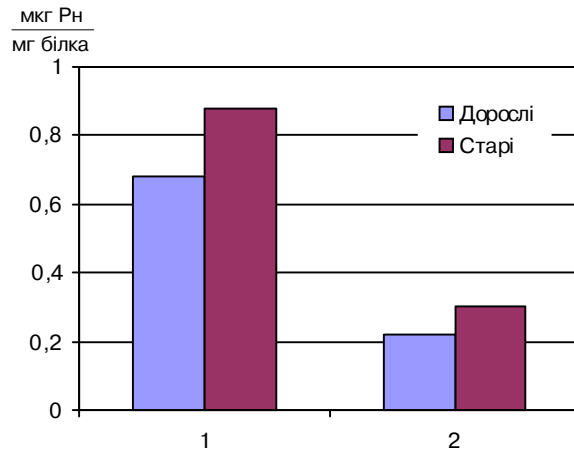


Рис. 1. Співвідношення ФЛ/білок у гомогенатах серця дорослих і старих щурів у нормі (1) та після імобілізаційного стресу (2).

дослідних вікових груп різко зменшувалося і складало при цьому в старих тварин 34 %, а у дорослих – 32 % від його вихідного рівня.

Безсумнівно, поява змін з боку величини співвідношення ФЛ/білок зумовлена модуляцією фосфоліпідного складу серцевого м'яза. З огляду на це, було проведено вивчення фосфоліпідного спектра гомогенату серцевого м'яза інтактних дорослих і старих щурів, а також тварин, підданих імобілізаційному стресу.

Виконані дослідження дозволили виявити вікові особливості фосфоліпідної організації

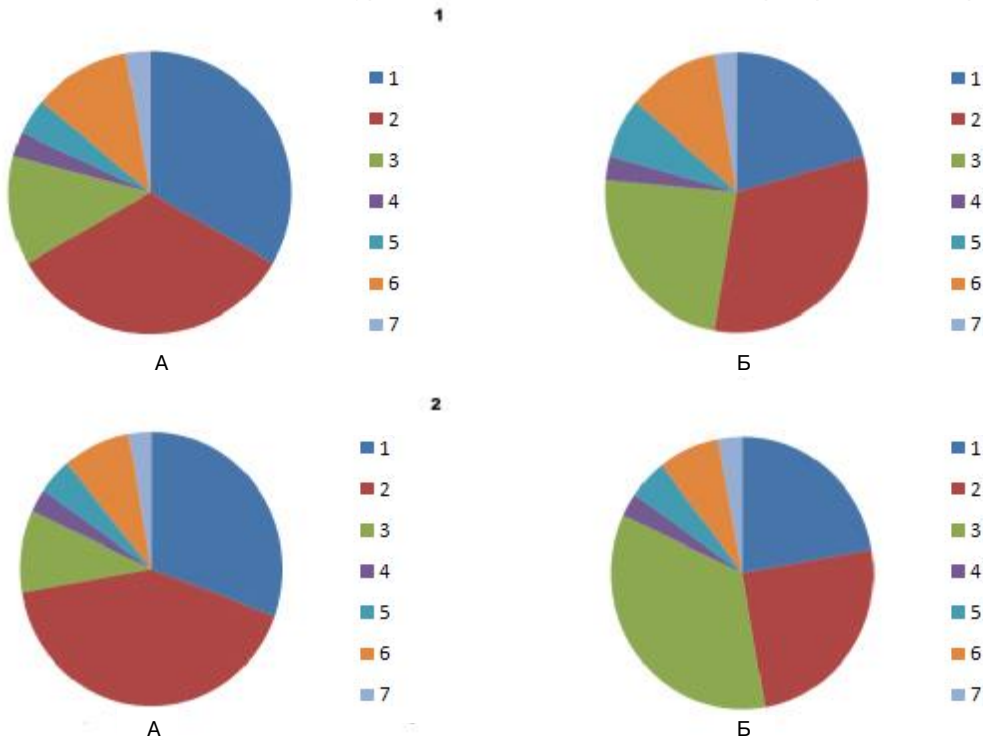


Рис. 2. Фосфоліпідний спектр гомогенатів серця дорослих (1) і старих (2) щурів у нормі (А) та після імобілізаційного стресу (Б): 1 – фосфатидилхолін; 2 – фосфатидилетаноламін; 3 – фосфатидилсерин + фосфатиділінозитол; 4 – вільні жирні кислоти; 5 – лізофосфатидилхолін; 6 – кардіоліпін. Вміст фосфоліпідів виражено у % від їх суми.

серця (рис. 2). Встановлено, що у фосфоліпідному спектрі міокарда старих щурів збільшена частка лізофосфатидилхоліну (ЛФХ), а також фосфатидилетаноламіну (ФЕ), в середньому на 20 % і, навпаки, зменшена частка фосфатидилхоліну (ФХ) на 17 % порівняно з величиною аналогічного показника в інтактних дорослих тварин.

Встановлені вікові відмінності у фосфоліпідному складі серця старих тварин доповнювалися різким обмеженням швидкості включення радіоактивної мітки з $1\text{-}^{14}\text{C}$ оцтовою кислотою до складу ФХ і ФЕ (рис. 3). Причому зменшення величини питомої радіоактивності ФЕ у старих щурів, порівняно з дорослими, було в 1,8 раза більшим, ніж зниження питомої радіоактивності ФХ.

Характер змін, що виникають у фосфоліпідній структурі гомогенатів серця, дозволяє припускати їх взаємозв'язок або зі стимуляцією гідролізу фосфоліпідів за рахунок фосфоліпази A_2 , або з гальмуванням процесу реакціювання даного лізофосфатиду, або з обмеженням швидкості метилювання ФЕ у ФХ.

Беручи до уваги літературні дані про зниження рівня енергозабезпечення кардіоміоцитів при старінні [6, 9] і наведені вище результати вивчення швидкості включення радіоактивної мітки з $1\text{-}^{14}\text{C}$ оцтовою кислотою у ФХ і ФЕ, більш обґрунтовано припустити, що основною причиною накопичення ЛФХ у серці старих тварин є обмеження швидкості реакціювання лізофосфатидів у серці. Слід зауважити, що формування дефіциту в забезпеченні міокарда макроергічними фосфатами при старінні може лежати і в основі зниження частки ФХ у фосфоліпідному спектрі міокарда. Це пов'язано з енергозалежним характером основних шляхів біосинтезу цього фосфоліпиду, в тому числі процесу метилювання ФЕ.

При стресі у тварин обох вікових груп виникали односпрямовані зміни з боку фосфоліпідної структури міокарда. Вони проявлялися різким зменшенням частки ФХ і ФЕ, а також накопиченням ЛФХ і фракції, яка містила у своєму складі фосфатидилсерин і фосфатидилінозитол (ФС + ФІ) (рис. 2).

Крім цього, за умов іммобілізації у тварин формувалися і деякі вікові відмінності в характері модифікації фосфоліпідної структури серця. Так, у дорослих щурів при іммобілізації відбувалося різке зменшення частки ФХ, а в старих – ФЕ у фосфоліпідному спектрі. Зростання вмісту фосфоліпідної фракції, яка містила у своєму складі ФС і ФІ, було більш значним у серці старих щурів, а ЛФХ – у дорослих тварин.

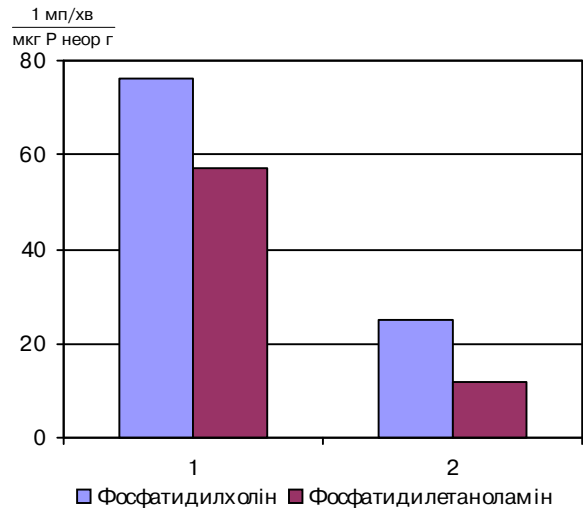


Рис. 3. Швидкість включення радіоактивної мітки з $1\text{-}^{14}\text{C}$ оцтовою кислотою до складу ФХ та ФЕ серця дорослих (1) і старих (2) щурів.

Оцінюючи причини появи змін, необхідно відзначити відомий факт стресової стимуляції ліполітичних процесів у серці, в тому числі активацію фосфоліпази A_2 [3]. З активацією цього ферменту в міокарді щурів при стресі може бути пов'язане зменшення вмісту в ньому ФХ, а також накопичення ЛФХ.

Певну роль у зниженні вмісту ФЕ в серці щурів при стресі, поряд зі стимуляцією процесу його часткового гідролізу фосфоліпазою A_2 , очевидно, відіграє і зменшення швидкості його біосинтезу. Важливе значення може мати гальмування фосфатидилсериндекарбоксилазної (ФСДК) реакції. Останнє підтверджується отриманими нами даними про збільшення частки фосфоліпідної фракції в міокарді, що містить у своєму складі ФС. Літературні дані про регуляторний ефект адреналіну на ФСДК [7] дозволяють припускати участь даного ферменту в механізмі посилення ефекту стресорного зниження ФЕ в серці старих тварин порівняно з дорослими.

Аналізуючи результати проведених досліджень, можна зробити висновок, що розвиток іммобілізаційного стресу в дорослих і старих щурів супроводжується формуванням характерного комплексу змін з боку фосфоліпідного складу гомогенатів серця. Його поява пов'язана з посиленням гідролізу фосфоліпідів фосфоліпазою A_2 і зниженням швидкості декарбоксилювання ФС у ФЕ в фосфатидилсериндекарбоксилазній реакції. Вікові відмінності при цьому зумовлені різницею в кількісних проявах зрушень, що виникають у дорослих і старих щурів. Їх поява, очевидно, зумовлена особливостями регуляції ліпідного обміну серця при старінні, пов'язаними насамперед зі зміною адренореактивності серця [17].

ВИСНОВКИ. 1. Старіння супроводжується модуляцією фосфоліпідної структури серця, причиною чого може бути поява вікових змін у фосфоліпідній організації мембран кардіоміоцитів.

2. Зміна складу ліпідного бішару клітинних мембран при старінні призводить до модифікації його фізико-хімічних властивостей [4, 8, 14], у результаті чого виникають умови для модуляції трансмембранного перенесення сиг-

налу в клітину і порушення нормального перебігу електрофізіологічних процесів на сарколемі [16].

3. Модуляція фосфоліпідної структури міокарда може бути одним із факторів зниження його адренореактивності при старінні. Водночас зміна адренореактивності набуває особливого значення при з'ясуванні характеру змін у фосфоліпідному складі серцевого м'яза за умов стресу.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Биологические мембраны. Методы / под ред. Дж. Финделя, У. Эванза. – М. : Мир, 1990. – 424 с.
2. Кейтс М. Техника липидологии. – М. : Мир, 1975. – 282 с.
3. Меерсон Ф. З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца / Ф. З. Меерсон. – М. : Медицина, 1984. – 270 с.
4. Состав и свойства клеточных мембран тканей животных с разной продолжительностью жизни / О. К. Кульчицкий, Л. Н. Богацкая, Р. Н. Потапенко, В. Е. Сабко // Продолжительность жизни. – К., 1991. – С. 71–72.
5. Фролькис В. В. Старение и увеличение продолжительности жизни / В. В. Фролькис. – Л. : Наука, 1988. – 239 с.
6. Фролькис В. В. Старение и экспериментальная возрастная патология сердечно-сосудистой системы / В. В. Фролькис, В. В. Безруков, О. К. Кульчицкий. – К. : Наук. думка, 1994. – 320 с.
7. Якушев В. С. Влияние адреналина и ацетилхолина на активность фосфатидилсериндекарбоксилазы сердца / В. С. Якушев, В. В. Давыдов // Фармакол. и токсикол. – 1985. – № 3. – С. 45–46.
8. Biochemical changes of rat brain membrane with ageing / G. Caldorini, C. Bonetti, A. Battistella [et al.] // Neurochem. Res. – 1983 – **8**, № 4. – P. 483–492.
9. Davydov V. V. Adenine nucleotide and creatine phosphate pool adult and old rat in heart during immobilization stress / V. V. Davydov, V. N. Shvets // Gerontology. – 2002. – **48**. – P. 81–83.
10. Davydov V. V. Age-dependent differences in the stimulation of lipid peroxidation in the heart of rats during immobilization stress / V. V. Davydov, V. N. Shvets // Exp. Gerontol. – 2003. – **38**, № 6. – P. 693–698.
11. Lowry O. Protein measurement with the Pholin phenol reagent / O. Lowry, K. I. Resebrought, A. L. Farr // J. Biol. Chem. – 1951. – **193**, № 1. – P. 265–275.
12. Martin I. Oxidative damage and age-related functional declines / I. Martin, M. S. Grotewiel // Mech. Ageing Dev. – 2006. – **127**, № 5. – P. 411–423.
13. Mitochondrial biogenesis and healthy aging / G. Lopez-Luch, P. M. Irusta, P. Navas, R. de Cabo // Exp. Gerontol. – 2008. – **43**, № 9. – P. 813–819.
14. Pepe S. Dietary polyunsaturated fatty acids and age-related membranes / S. Pepe // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2007. – **1114**. – P. 381–388.
15. Sahin E. Immobilization stress in rat tissues: alteration of protein oxidation, lipid peroxidation and antioxidant defense system / E. Sahin, S. Gumuslu // Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol. – 2007. – **144**, № 4. – P. 324–347.
16. Susceptibility to ventricular arrhythmias in aged heart / S. Rossi, S. Baruffi, A. Bertuzzi [et al.] // Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. – 2007. – № 1. – P. 410–414.
17. Weiss B. Modulation of adrenergic receptors during aging / B. Weiss // Neurobiol. Aging. – 1988. – **9**, № 1. – P. 61–62.

ФОСФОЛИПИДНИЙ СОСТАВ ГОМОГЕНАТА СЕРДЦА ВЗРОСЛЫХ И СТАРЫХ КРЫС И ОСОБЕННОСТИ ЕГО МОДУЛЯЦИИ ПРИ СТРЕССЕ

Резюме

Целью работы было изучить фосфолипидный состав гомогенатов сердца взрослых и старых крыс, а также установить возрастные особенности его модуляции при иммобилизационном стрессе. Проведенные исследования показали, что развитие иммобилизационного стресса у взрослых и старых крыс сопровождается формированием характерного комплекса изменений со стороны фосфолипидного состава гомогенатов сердца. Его появление обусловлено усилением гидролиза фосфолипидов фосфолипазой A_2 и снижением скорости декарбоксилирования фосфатидилсерина в фосфатидилэтаноламин в фосфатидилсериндекарбоксилазной реакции. Возрастные различия при этом заключаются в количественных проявлениях возникающих сдвигов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **фосфолипидный спектр, фосфатидилсеринкарбоксилазная реакция, старение, миокард, иммобилизационный стресс.**

V. M. Shvets
ZAPORIZHIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

PHOSPHOLIPID COMPOSITION OF THE HEART HOMOGENATE OF THE ADULT AND OLD RATS, AND PECULIARITIES OF ITS MODULATION UNDER STRESS

Summary

The aim of the work was to study the phospholipids composition of the heart homogenates of adult and old rats, and to determine its age-modulation under the immobilization stress. Studies showed that the development of immobilization stress in adult and rats is accompanied by the formation of the characteristic complex of changes in the phospholipids composition of the heart homogenates. Its appearance is due to increased hydrolysis of phospholipids by phospholipase A_2 and a decrease in the rate of decarboxylation of PS in PE in the phosphatidylserine carboxylic reaction. Age differences are about the quantity changes of the occurring shifts.

KEY WORDS: **phospholipids composition, phosphatidylserine carboxylic reaction, ageing, myocardium, immobilization stress.**

Отримано 22.05.13

Адреса для листування: В. М. Швець, Запорізький державний медичний університет, просп. Маяковського, 26, Запоріжжя, 69035, Україна.